

Family list

1 family member for:

JP4217916

Derived from 1 application.

1 ANTI-INFLAMMATORY AGENT

Publication info: **JP4217916 A** - 1992-08-07

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-217916

(43)Date of publication of application : 07.08.1992

(51)Int.Cl. A61K 31/165
 A61K 31/165
 A61K 31/165
 A61K 31/165
 A61K 31/165
 A61K 31/165
 A61K 31/165
 A61K 31/165
 A61K 31/165
 C07C235/58
 C07C235/60
 C07C235/62
 C07C235/64
 C12N 9/99

(21)Application number : 03-091658

(71)Applicant : JAPAN TOBACCO INC

(22)Date of filing : 29.03.1991

(72)Inventor : HONDA ICHIRO
 NOGUCHI MASATO
 FUKUSHIMA ATSUSHI
 FURUNO MASAHIRO
 MATSUMOTO TAKASHI
 SHIBAGAKI MAKOTO
 NOMA MASAKATA
 YOSHIDA SHIGEO
 YONEYAMA KOICHI

(30)Priority

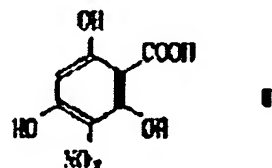
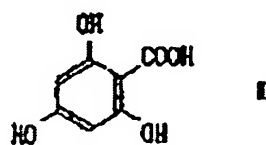
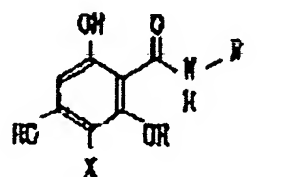
Priority number : 40216137 Priority date : 21.06.1990 Priority country : JP

(54) ANTI-INFLAMMATORY AGENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide an anti-inflammatory agent containing a 3-nitro-2,4,6-trihydroxybenzoic acid derivative as an active ingredient and inhibiting the biosynthesis of prostaglandins and leucotrienes.

CONSTITUTION: The anti-inflammatory agent comprises a compound of formula I (X is NO₂, H; R is 1-18C alkyl, cycloalkyl, substituted phenyl, phenyl-1-5C alkyl, substituted phenoxyalkoxyalkyl, substituted phenoxyphenyl when X is NO₂, or R is 6-10C alkyl; substituted phenoxyalkyl, substituted phenoxyphenyl when R is H), e.g. N-butyl-3-nitro-2,4,6-trihydroxybenzamide as an active ingredient. The compound of formula I is produced by reacting phloroglucin carboxylic acid of formula II with a mixture of sulfuric acid and nitric acid and subsequently condensing the nitrated compound of formula III with an amine of formula RNH₂ in the presence of a condensing agent.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-217916

(43) 公開日 平成4年(1992) 8月7日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/165	A E L	8413-4C		
	A B E	8413-4C		
	A B F	8413-4C		
	A C D	8413-4C		
	A C L	8413-4C		

審査請求 未請求 請求項の数3(全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-91658	(71) 出願人	000004569 日本たばこ産業株式会社 東京都品川区東品川4丁目12番62号
(22) 出願日	平成3年(1991) 3月29日	(72) 発明者	本多 一郎 神奈川県横浜市緑区梅が丘6番地2 日本 たばこ産業株式会社生命科学研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平2-161376	(72) 発明者	野口 正人 神奈川県横浜市緑区梅が丘6番地2 日本 たばこ産業株式会社生命科学研究所内
(32) 優先日	平2(1990) 6月21日	(72) 発明者	福岡 淳 神奈川県横浜市緑区梅が丘6番地2 日本 たばこ産業株式会社生命科学研究所内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 鈴江 武彦 最終頁に続く

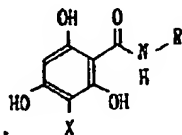
(54) 【発明の名称】 抗炎症剤

(57) 【要約】

【目的】 プロスタグランジン類及びロイコトリエン類の増加に起因する炎症及びその他の疾病に対する治療効果を有する抗炎症剤を提供する。

【構成】 化1に示す一般式で表される活性成分を有する抗炎症剤。

【化1】



(式中、Xは、NO₂またはHである。一方、X=NO₂の場合、Rは1ないし18個の炭素原子からなる直鎖アルキル及びシクロヘキシル、置換フェニル、並びに1ないし5個の炭素原子を有するフェニルアルキル及び2ないし10個の炭素原子を有する置換フェノキシアルキル、置換フェノキシフェニルであり、また、X=Hの場合、Rは6ないし10個の炭素原子からなる直鎖アルキル並びに2ないし10個の炭素原子を有する置換フェノ

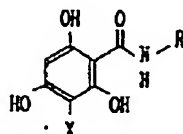
キシアルキル、置換フェノキシフェニルである。)

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 化1に示す一般式で表される活性成分を有する抗炎症剤。

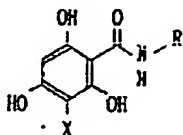
【化1】



(式中、Xは、NO₂ またはHである。一方、X=NO₂ の場合、Rは1ないし18個の炭素原子からなる直鎖アルキル及びシクロヘキシル、置換フェニル、並びに1ないし5個の炭素原子を有するフェニルアルキル及び2ないし10個の炭素原子を有する置換フェノキシアルキル、置換フェノキシフェニルであり、また、X=Hの場合、Rは6ないし10個の炭素原子からなる直鎖アルキル並びに2ないし10個の炭素原子を有する置換フェノキシアルキル、置換フェノキシフェニルである。)

【請求項2】 化2に示す一般式で表される活性成分を有するプロスタグランジン類生合成阻害剤。

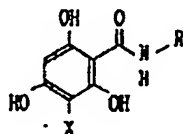
【化2】



(式中、Xは、NO₂ またはHである。一方、X=NO₂ の場合、Rは1ないし18個の炭素原子からなる直鎖アルキル及びシクロヘキシル、置換フェニル、並びに1ないし5個の炭素原子を有するフェニルアルキル及び2ないし10個の炭素原子を有する置換フェノキシアルキル、置換フェノキシフェニルであり、また、X=Hの場合、Rは6ないし10個の炭素原子からなる直鎖アルキル並びに2ないし10個の炭素原子を有する置換フェノキシアルキル、置換フェノキシフェニルである。)

【請求項3】 化3に示す一般式で表される活性成分を有するロイコトリエン類生合成阻害剤。

【化3】



(式中、Xは、NO₂ またはHである。一方、X=NO₂ の場合、Rは1ないし18個の炭素原子からなる直鎖アルキル及びシクロヘキシル、置換フェニル、並びに1ないし5個の炭素原子を有するフェニルアルキル及び2ないし10個の炭素原子を有する置換フェノキシアルキル、置換フェノキシフェニルであり、また、X=Hの場合、Rは6ないし10個の炭素原子からなる直鎖アルキル並びに2ないし10個の炭素原子を有する置換フェノキシアルキル、置換フェノキシフェニルである。)

2

ル並びに2ないし10個の炭素原子を有する置換フェノキシアルキル、置換フェノキシフェニルである。)

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、プロスタグランジン類及びロイコトリエン類の生合成を阻害する抗炎症剤に関する。プロスタグランジン類は、炎症の原因物質であり、ロイコトリエン類は、アレルギー、炎症等の原因物質である。従って、本発明の化合物は、プロスタグランジン類及びロイコトリエン類によって惹起される炎症の治療に有用である。

【0002】

【従来の技術】 プロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエン等に代表されるアラキドン酸代謝物は、多くの生理作用を有し、生体の恒常性維持などに極めて重要なホルモンである。アラキドン酸代謝物の生理作用は、その量が極めて大きな影響を与える。外的要因等により生体内のアラキドン酸代謝物の量に変化が起こると、種々の疾病の発生につながる事が知られている。特に、多量のプロスタグランジン類は、炎症の原因物質として広く知られている。また、多量のロイコトリエン類は、気管支喘息(Samuelsson, Prostaglandins, 17, 785-787, 1979, Barnes, Thorax, 39, 500-504, 1984, Weiss, Science, 196-198, 1980, 福田健 他, アレルギー, 15, 12~23, 1986)、皮膚アレルギー、乾癬 (Black, A. J., J. Invest. Dermatol., 89, 337, 1987)等のアレルギー性疾患、腎炎等の炎症、気管支喘息、皮膚アレルギー、虚血性疾患 (Nishida, M., Circulation, 76, 482, 1987)、消化性潰瘍、肝障害等の疾病に強く関与していることが知られている(現代医療 vol. 21, P53, 1989)。

【0003】 プロスタグランジン類及びロイコトリエン類は、図1に示す如く、アラキドン酸から生合成される。なお、図中、PGは、プロスタグランジン、TXA₂は、トロンボキサン、LTは、ロイコトリエン、5-HPETEは、5-ヒドロペルオキシ-6,8,11,14-エイコサテトラエン酸、5-HETEは、5-ヒドロキシ-6,8,11,14-エイコサテトラエン酸を示す。

【0004】 図1に示すアラキドン酸カスケードからわかるとおり、ホスホリパーゼ A₂ により細胞膜のリン脂質から合成されたアラキドン酸は、まず、シクロオキシゲナーゼによって、2分子の酸素が添加され、プロスタグランジン G₂ に変換される。次いで、ヒドロペルオキシダーゼによって、プロスタグランジン H₂ に変換される。このプロスタグランジン H₂ から、各種酵素によって、プロスタグランジン I₂、プロスタグランジン F₂、プロスタグランジン D₂、プロスタグランジン E₂、トロンボキサン A₂ が生合成され、各種炎症の原因となっている。

【0005】 一方、アラキドン酸は、5-リポキシゲナーゼにより酸化・脱水されてロイコトリエンA₄ に変換さ

3

れる。すなわち、5-リボキシゲナーゼは、アラキドン酸を酸化する5-オキシゲナーゼ活性と、これにより産出される5-HPBTBを脱水してロイコトリエンA₄に変換するロイコトリエンA₄合成酵素活性を有する。

【0006】従って、シクロオキシゲナーゼ及び5-リボキシゲナーゼの酵素活性を阻害することにより、上記説明したプロスタグランジン類及びロイコトリエン類に起因する各種疾病を治療することができる。

【0007】従来、プロスタグランジン類の生合成阻害薬としては、例えば、アスピリン、シクロフェナク、メフェナム酸、メクロフェナム酸、インドメタシン、フェニルブタゾン、ビルプロフェン、オキシフェンブタゾン等が知られている。また、ロイコトリエン類の生合成阻害薬としては、例えば、フェニドン、カフェイン酸等が知られている。(現代医療 vol. 21, P53, 1989)

【0008】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、同じアラキドン酸代謝物であるプロスタグランジン類及びロイコトリエン類は、炎症患部において、相互に作用して炎症反応を増幅させていることが知られている(星、医薬ジャーナル、Vol. 26, No. 5, 1990/P933)。従って、シクロオキシゲナーゼ又は5-リボキシゲナーゼの酵素活性の一方のみを阻害しても十分な抗炎症効果は得られなかった。

【0009】本発明は、かかる点に鑑みてなされたものであり、プロスタグランジン類及びロイコトリエン類の増加に起因する炎症及びその他の疾病を十分に抑制することができる抗炎症剤を提供するものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】アラキドン酸カスケードの上下に位置するホスホリパーゼ A₂ 及びシクロオキシゲナーゼの両酵素を阻害することによって、プロスタグランジン類及びロイコトリエン類の両者の生合成を阻害する、所謂、ダブルインヒビターが考えられる。ダブルインヒビターとしては、ヒドロコルチゾン等のステロイド剤やアルミノプロフェンが知られている(星、医薬ジャーナル、Vol. 26, No. 5, 1990/P933)。

【0011】一方、アラキドン酸カスケードにおいて並列関係にあるシクロオキシゲナーゼ及び5-リボキシゲナーゼの酵素活性を両方とも阻害する、所謂、デュアルインヒビターが提案されているが、抗炎症剤として十分な治療効果を有するものは知られていなかった。

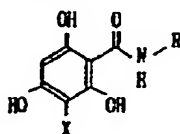
【0012】上記課題を解決するために鋭意検討した結果、すでに、光合成阻害剤として公知である化4に示す一般式(I)を有する(3-ニトロ)-2,4,6-トリヒドロキシ安息香酸誘導体(特開平第1-228949号公報)が、上述のアラキドン酸カスケードにおいてシクロオキシゲナーゼ及び5-リボキシゲナーゼの両酵素を阻害し、プロスタグランジン類及びロイコトリエン類生合成を抑制して、プロスタグランジン類及びロイコトリエン類が惹起

4

する炎症等の疾病を治療する顕著な効果を有するデュアルインヒビターであることを見出した。

【0013】

【化4】

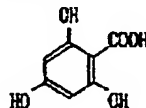


(I)

10 (式中、Xは、NO₂ またはHである。一方、X=NO₂ の場合、Rは1ないし18個の炭素原子からなる直鎖アルキル及びシクロヘキシル、置換フェニル、並びに1ないし5個の炭素原子を有するフェニルアルキル及び2ないし10個の炭素原子を有する置換フェノキシアルキル、置換フェノキシフェニルであり、また、X=Hの場合、Rは6ないし10個の炭素原子からなる直鎖アルキル並びに2ないし10個の炭素原子を有する置換フェノキシアルキル、置換フェノキシフェニルである。)一般式(I)中、X=NO₂ である3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシ安息香酸誘導体は、特願平第1-231778号に開示された製造方法により製造できる。すなわち、一般式；

【0014】

【化5】

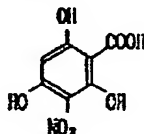


(II)

で表されるフロログルシニカルボン酸を硫酸と硝酸との混合物と反応させてニトロ化することにより一般式；

【0015】

【化6】



(III)

で表される3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシ安息香酸を得、ついでこの化合物(III)を一般式；RNH₂

40 (式中、X=NO₂ の場合、Rは1ないし18個の炭素原子からなる直鎖アルキル及びシクロヘキシル、置換フェニル、並びに1ないし5個の炭素原子を有するフェニルアルキル及び2ないし10個の炭素原子を有する置換フェノキシアルキル、置換フェノキシフェニルである。)で表されるアミンとを縮合剤の存在下に縮合させて本発明の3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシカルボン酸誘導体(I)を得ることができる。

【0016】なお、一般式(I)中、X=Hである2,4,6-トリヒドロキシカルボン酸誘導体は、上記説明した製

造方法からニトロ化の工程（化合物(III) から化合物(I)を得る工程）を省き、縮合の工程で用いられるアミンとしてRNH₂（式中、Rは6ないし10個の炭素原子からなる直鎖アルキル並びに2ないし10個の炭素原子を有する置換フェノキシアルキル、置換フェノキシフェニルである）を用いることにより同様の方法で製造することができる。

【0017】本発明の抗炎症剤の成人あたりの投与量は、患者の症状に応じて適宜定められるが、通常体重1kgあたり1mg~100mgである。

【0018】また、投与経路は、経口、皮下注射、静脈注射、局所的投与等が望ましいが特に限定されるものではない。

【0019】また、投与する薬剤の形態は、製剤学的に許容し得る賦形剤または溶剤との混和により、常法で散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、注射剤、局所用剤等に調製することもできる。

【0020】

【実施例】以下、本発明の抗炎症剤を製造し、その効果を調べた結果について説明する。

【0021】<A>3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロキシカルボン酸誘導体(I)の製造N-ブチル-3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロベンズアミド(I, R=ブチル基)を、特願第1-2317785号公報の実施例に従って以下の如く製造した。

【0022】(1)機械式かき混ぜ器を備えた500ml容の四つ口フラスコに200mlの60%(v/v)硫酸をいれ、氷冷した。これに18.8g(0.1mol)のフロログルシンカルボン酸(II)を徐々に加え、均一になるまで(約15分間程度)攪拌した。更に、60%硝酸15.6mlを徐々に加え、氷冷しながら約3時間攪拌した。

【0023】反応生成物を砕いた氷200gの上にあげ、生じた沈殿物を濾取した。この沈殿物を氷冷した塩酸性飽和食塩水で洗浄したのち500mlの熱メタノール中に溶解し、不要物を濾別後減圧下濃縮乾燥し、収量20gで3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロカルボン酸(III)の粗製物を得た。

【0024】(2)塩化カルシウム乾燥管をつけた200ml容のフラスコ中で、工程(1)で得られた3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロカルボン酸(III)の粗製物860mg(4ミリモル)を720mg(6ミリモル)のN-ヒドロキシスクシンイミドとともに無水テトラヒドロフラン(THF)100mlに、室温にて溶解し、その後氷冷した。更に、830mg(4ミリモル)のジクロロヘキシルカルボジイミド(DCC)のTHF溶液を徐々に加え、このまま約20分間攪拌を続けた。次に、292mg(4ミリモル)のブチルアミンのTHF溶液を滴下した後室温に戻し、更に3時間攪拌した。

【0025】この反応液の不溶物をひだおり濾紙により濾過し、減圧下濃縮後、ヘキサン：酢酸エチル：ギ酸=300:100:1を用いるシリカゲルカラムにより精製した。

これから、熱ヘキサンを用いて再結晶しN-ブチル-3-ニトロ-2,4,6-トリヒドロベンズアミド(被験化合物A1)を得た。収率は65%であり、物性データは、標準物質のものとは一致した。

【0026】工程(2)において使用したブチルアミンに代えて、各種アミンを各4ミリモルを使用した他は、工程(1)、(2)と同様にして、それぞれ対応するアルキル基を有する、第1表~第3表に示すA2以下の化合物を製造した。

10 【0027】 生物検定法

本発明の抗炎症剤の効果を確かめるために、以下に示す生物検定法を行った。

【0028】(1)プロスタグランジン生合成阻害効果
本発明の抗炎症剤のプロスタグランジン生合成阻害効果について、次のようなウサギの腎臓から得た酵素・シクロオキシゲナーゼに対する阻害活性について生物検定法を行った。

【0029】【酵素の精製】ウサギ(White Rabbit)を解剖して腎臓を摘出する。腎臓の表皮、脂肪を取り除き、約3等分に輪ざりする。輪ざりにした腎臓を、適量のリン酸緩衝液(0.1M, pH=7.5)(以下、緩衝液1と記す)に浸漬して洗浄する。この後、腎臓の表皮を取り除き、内側の脂肪を取り除き、髄質のみにする。該髄質を還元型グルタチオンを1mMを含むリン酸緩衝液(0.1M, pH=7.5)(以下、緩衝液2と記す)に懸濁し、テフロンガラスホモジナイザーで粉砕する。この粉砕物を、9000xg、15分、4℃で遠心し、氷冷下で二重にしたガーゼで濾過して固形物を除去する。次いで、濾液を100000xg、1時間超遠心する。上清を沈殿が舞い上がらないようにして捨て、沈殿を緩衝液2で洗浄する。この後、沈殿を、最初に用いた腎臓髄質とほぼ同量の緩衝液2で懸濁する。この懸濁液をガラスホモジナイザーに移し、数回ピストン運動させて均一にホモジナイズする。このようにして得た懸濁液を、プロスタグランジン生合成酵素液として、以下の生物検定に使用する。なお、この酵素液は、少量(約500μl)ずつ分注し、ドライアイス・アセトンで瞬間的に凍結させた後、-80℃で保存し、使用時に適宜氷上で解凍して使用した(U.Sankawa et al, Prostaglandins, 24, 21(1982))。

【0030】【生物検定】まず、下記に示すような検定溶液を、後述する生物検定の直前に作成した。

【0031】

10mM	ヘモグロビン	5μl
40mM	トリブトファン	50μl
80mM	還元型グルタチオン	10μl
0.5mM	リン酸緩衝液(pH7.5)	40μl
	精製水	63μl
	酵素液	20μl
	計	188μl

50 前記検定溶液に、適当な濃度の被験化合物のDMSO溶液2

μl 及び1.35 μCi の放射活性を有するアラキドン酸のエタノール溶液10 μl を加えて、全量200 μl 、の反応溶液を調製した。この反応溶液を、37℃の振とう培養器で20分間反応させた。

【0032】この後、反応溶液に1N塩酸50 μl を添加して反応を停止させ、ジエチルエーテル250 μl を加えた。次いで、この溶液を、2000rpm、5分間遠心分離し、この上清50 μl を薄層クロマトグラフ上で下記条件において展開した。

【0033】薄層クロマトグラフの展開条件
薄層 (TLC): Watman HPTLC 10×10cm, 0.2 mm, 厚さ (No. 4805-411)

溶 媒: トリクロロメタン: メタノール: 酢酸=108:6:6

展開後、薄層をイメージ・アナライザー (富士写真フ

*ルム製) BA100のイメージング・プレートで終夜露光した。この後、露光した薄層を、BA100システム (富士写真フイルム製) で放射活性の測定を行った。

【0034】この際、被験化合物を含む検定区のアラキドン酸からの変換物であるプロスタグランジン E_2 (PGE₂) 百分の放射活性値を、無処理区の PGE₂ 百分の放射活性値の百分率、すなわち無処理区に対する変換率を、プロスタグランジン生合成阻害活性とした。なお、ポジティブ・コントロールとしては、インドメタシン (IC50は、0.75 μM である) を用いた。

【0035】上記説明した如く、各種被験化合物およびインドメタシンについて、化合物濃度が 10^{-5}M および 10^{-6}M の場合について生物検定を行い、プロスタグランジン生合成阻害活性値を求めた結果を第1表に示す。

【0036】

第1表

X=NO ₂ の場合		プロスタグランジン生合成阻害活性値 (%)	
被験化合物	R	被験化合物の濃度	
		10^{-5}M	10^{-6}M
A 4	ブチル	49.5	76.5
A 6	ヘキシル	33.7	65.2
A 8	オクチル	26.4	71.1
A 1 1	ウンデシル	44.1	68.7
A 1 3	トリデシル	53.9	65.7
P 1	フェニル	31.2	85.1
P 2	オルトクロロフェニル	39.5	
P 4	パラクロロフェニル	23.7	
P 1 2	フェニルブチル	24.8	
インドメタシン		—	31.6

上記第1表から明らかなように、各種被験化合物は、 $10^{-5}\sim 10^{-6}\text{M}$ の範囲内で、シクロオキシゲナーゼによるプロスタグランジン生合成の阻害活性を有することが確認された。

【0037】次に、無傷細胞内のシクロオキシゲナーゼに対するプロスタグランジン生合成阻害活性について、次のようにして生物検定を行った。

【0038】1. ヒト骨髓性白血病細胞HL60株の分化誘導

10^{-6}M レチノイン酸 (シグマ社製) 及び10重量%ウシ胎児血清を含有する培地 (RPMI1640, 日水製薬 (株)) で、ヒト骨髓性白血病細胞HL60株 (癌研究振興財団より入手) を、 2×10^5 個/mlになるように細胞数を調節して、5日間、37℃、5%二酸化炭素の条件下で培養した。レチノイン酸で分化誘導させたHL60株は、シクロオキシゲナーゼ活性が上昇することが判っている (Biochimica et alBiophysica Acta 877(1986)p.423 ~432)。

【0039】2. 活性の測定

上述のように培養した細胞を遠心分離により回収し、Ha

nks 平衡塩液で2回洗浄し、緩衝液 (50mMトリス塩酸 (pH7.5), 0.14M NaCl, 2 mM CaCl₂) に 1×10^7 個/200 μl となるように浮遊させた。

【0040】この細胞溶液に、1mMの被験化合物 P12 (一般式 (I)において、X=NO₂、R=フェニルブチル) のDMSO溶液1 μl を加えた。

【0041】さらに、該細胞溶液に、カルシウムイオンフォア (シグマ社製) を10 μM 、[¹⁴C]アラキドン酸 (50 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, アマシャム社製) を4 μM になるように加え、37℃で5分間反応させた。この後、反応停止液 (ジエチルエーテル/メタノール/0.2Mクエン酸=30/4/1, -20℃) 300 μl を加え、15秒間攪拌した。次いで、この溶液を、12000 ×g で数分間遠心し、その有機層を、薄層としてシリカゲル60F 254, メルク社製) 、展開液として、クロロホルム/メタノール/酢酸/水=90/8/1/0.8を用いて薄層クロマトグラフにかけた。この薄層を乾燥した後、イメージ・アナライザー BA100のイメージング・プレートに密着し、そのイメージング・プレートを BA100システムにより、放射能分布を調べた。

【0042】なお、コントロールとして、被験化合物 P12を加えていないもの、ポジティブ・コントロールとして、被験化合物 P12に代えて、100 μ Mインドメタシン（和光純薬社製）を加えて、上述の如く、生物検定を行った。

【0043】このようにして得られた薄層上の放射能分布において、コントロールでは、プロスタグランジン E₂ のスポットが見られたが、被験化合物 P12を加えたもの及びポジティブ・コントロールでは、プロスタグランジン E₂ のスポットは消失していた。このことから、被験化合物 P12は、インドメタシンと同様に、細胞内のシクロオキシゲナーゼに対するプロスタグランジン生合成阻害活性を有することが確認された。

【0044】(2)ロイコトリエン生合成阻害効果
本発明の抗炎症剤のロイコトリエン生合成阻害効果について、次のような生物検定法を行った。

【0045】ここで、ロイコトリエン類生合成の初発酵素であるヒト5-リボキシゲナーゼの阻害活性を被験化合物のロイコトリエン類生合成阻害活性の指標とした。ヒト5-リボキシゲナーゼの阻害活性は、5-リボキシゲナーゼによるアラキドン酸の酸化により産出された5-HETEを5-HETEに変換して測定し、被験化合物が5-HETE産出を阻害する割合を求めることにより判定した。

【0046】〔酵素の精製〕野口らにより得られたヒト5-リボキシゲナーゼ産生大腸菌（特開平第2-219570号）を、以下に説明する如く、培養し、これを粗精製して実験に必要なヒト5-リボキシゲナーゼを得た。1. ヒト5-リボキシゲナーゼ産生大腸菌（菌株MV1184/ph5L0XC；微生物寄託番号FERMP-10250）を、以下の如く前培養した。すなわち、1 mlあたり100 mgのアンピシリンを加えた下記に示すLB培地120 mlに、ヒト5-リボキシゲナーゼ産生大腸菌を白金耳で少量接種して、約30℃で12時間培養した。

【0047】LB培地

バクトトリプトン 10 g / l
(Bacto tryptone; DIFCO社製)
酵母エキス 5 g / l
塩化ナトリウム 5 g / l

2. 前培養したヒト5-リボキシゲナーゼ産生大腸菌を、下記に示すTYSG培地にて、以下のように本培養した。すなわち、3リットル容量のひだつき三角フラスコ2本にTYSG培地各500 mlを入れ、これに工程1で前培養したヒト5-リボキシゲナーゼ産生大腸菌培養液5 mlずつ移植し、22℃で10時間培養した。

【0048】TYSG培地

バクトトリプトン 10 g / l
酵母エキス 5 g / l
塩化ナトリウム 20 g / l
グリセロール 20 ml / l
pH=7.8

3. 5-リボキシゲナーゼを誘導するために、工程2で本培養して培養液に1M イソプロピル- β -D- ジチオガラクトピラノサイド (IPTG) を120 mlずつ添加して、更に22℃で14時間培養した。4. 工程3で得た培養液を、6000rpm で6分間遠心分離にかけて集菌した。得られた菌体の重量は、約15gであった。5. 工程4で得られた菌体を、下記のKP-1緩衝液150 mlに懸濁して-70℃で保存した。

【0049】KP-1緩衝液

50mMリン酸カリウム緩衝液 (pH=7.1)
100mM 塩化ナトリウム
2mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)

6. 工程5の保存液を溶解した後に、保存液1 mlあたりジチオストレイトール (DDT) 0.3 mg、フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) 0.5mMを加え、その後、この溶液1 mlあたり50mgのリゾチームを加え、さらに氷中に1時間放置して菌を完全に溶解させた。

【0050】以下の操作は、酵素の失活をさけるために、すべて氷冷または約4℃で行った。

7. 工程6で得た溶液を超音波で処理し、菌を完全に破碎した。この超音波処理は、1分間間隔で1分間行い、同様の操作を5回行った。

8. 工程7で得た溶液を、6500rpm で20分間遠心し、その上清を分取した。分取した上清は、よく氷冷したメスシリンダで液量を測定して、上清1リットルあたりよく粉碎した硫酸 (30%硫酸) 176 g を加え攪拌した。硫酸が完全に溶解しても約1時間攪拌を続けた。このときに、2N水酸化ナトリウム溶液でpHを7 ~ 7.5の範囲内に維持した。

9. 工程8で得た溶液を6500rpm で20分間遠心し、その上清を分取した。分取した上清を、上清1リットルあたりよく粉碎した硫酸 (60%硫酸) 198 g を加えることを除き、工程7と同様に処理した。次に、処理した溶液を6500rpm で20分間遠心し、その沈殿 (30% - 60%硫酸画分) を得た。

10. 工程9で得た沈殿を下記に示すTES 緩衝液40mlに溶解し、透析して粗酵素溶液を得た。

【0051】TES 緩衝液

50mM トリス (pH= 8.0)
2 mM EDTA
1 mM DDT
20% (v/v) グリセロール

11. 工程9で得た粗酵素溶液を適量ごとに分注して-70℃で保存し、適宜解凍して使用した。

【0052】〔生物検定〕得られた粗酵素溶液を用い、以下に示す方法で生物検定を行った。

1. アッセイ溶液を、以下に示す如く調製した。まず、0.1Mトリス (pH8.0)、10mM塩化カルシウム、10mM ATP、5mM 還元型グルタチオンからなる緩衝液20 μ lに、水58 μ l、ヒト5-リボキシゲナーゼの酵素液10 μ l、被験化

合物のジメチルスルホキシド溶液 $10\mu\text{l}$ を加えて混合し、 30°C で5分間静置した。

【0053】なお、ここで緩衝液に塩化カルシウム及びATPを用いるのは、両者が、ヒト5-リボキシゲナーゼの活性化因子だからである。また、還元型グルタチオンを添加するのは、ヒト5-リボキシゲナーゼによりアラキドン酸から産出された5-HPETEを、優先的に5-HETEに変換させるためである。

2. 工程1で得たアッセイ溶液に50mMアラキドン酸 $2\mu\text{l}$ を添加して 30°C で10分間静置した。

3. $1\mu\text{l}$ あたり内部標準物質である13-ヒドロキシ-リノレン酸 200ng を含有する 0°C のメタノール $300\mu\text{l}$ を添加し、さらに1M酢酸 $1\mu\text{l}$ を添加した。この結果、ヒト5-リボキシゲナーゼによる酵素反応は停止する。

4. 工程3で得た溶液を 10000rpm で10分間遠心分離して上清を分取した。

5. 工程3で分取した上清 $100\mu\text{l}$ を、以下の分析条件で高速液体クロマトグラフにより分析した。

【0054】カラム: Capcell Pak C₁₈

(直径 4.6mm 、長さ 150mm)

溶媒: メタノール: 水: 酢酸=75:25:0.01

流速: $1.2\text{ml}/\text{分}$

カラム温度: 38°C

検出器: UV 233nm (吸光度)

6. 工程5で得た分析結果から、以下に示す如く阻害活性を判定した。すなわち、5-HETEのピーク面積を内部標準 (13-ヒドロキシ-リノレン酸) を基準として求め、

10 被験化合物を含まない無処理区での5-HETEのピーク面積に対する処理区のピーク面積を百分率で表して阻害活性とした。なお、ポジティブ・コントロールとしては、カフェイン酸 (IC_{50} は、約 10^{-3}M である) を用いた。

【0055】上記説明した如くに各種被験化合物について生物検定を行い、ヒト5-リボキシゲナーゼ酵素活性の50%阻害濃度を求めた結果を第2表～第3表に示す。

【0056】

第2表

X=NO ₂ の場合		ロイコトリエン類生成 50%阻害濃度 (μM)
被験化合物	R	
A1	メチル	5889
A2	エチル	2957
A3	プロピル	
A4	ブチル	2636
A5	ペンチル	
A6	ヘキシル	400
A7	ヘプチル	181
A8	オクチル	160
A9	ノニル	
A10	デシル	
A11	ウンデシル	200
A13	トリデシル	433
A18	オクタデシル	1625
A6'	シクロヘキシル	
51	N-エチルブチル	1900
52	N-メチルブチル	7060
101	フェニル	1000
102	2-クロロフェニル	1400
103	3-クロロフェニル	450
104	4-クロロフェニル	300
105	3,5-ジクロロフェニル	190
106	4-ブロモフェニル	
107	ベンジル	1750
108	フェネチル	460
109	R-(α)-フェネチル	
110	S-(α)-フェネチル	
111	フェニルプロピル	60
112	フェニルブチル	35

13		14
113	N-メチル フェニル	9240
114	3,4-ジクロロフェニル	130
115	2,3-ジクロロフェニル	150
116	2,4-ジクロロフェニル	
117	4-トリフルオロメチルフェニル	106
118	4-イソプロピルフェニル	
119	4-ジメチルアミノフェニル	
201	フェノキシエチル	
202	4-クロロフェノキシエチル	
203	2-フルオロフェニル	4466
204	3-フルオロフェニル	1217
205	4-フルオロフェニル	513
206	3-メトキシフェニル	
207	3,4-ジメトキシフェニル	
208	2-トリフルオロメチルフェニル	200
209	3-トリフルオロメチルフェニル	369
210	4-エチルフェニル	
211	4-(n)-プロピルフェニル	
212	2-メチルフェニル	
213	3-メチルフェニル	
214	4-メチルフェニル	
215	2-メトキシフェニル	
216	4-メトキシフェニル	
121	フェノキシブチル	270
122	フェノキシヘキシル	160
124	フェノキシオクチル	50
125	フェノキシデシル	
126	フェノキシフェノキシエチル	
127	フェノキシベンチル	40
217	フェノキシフェニル	
218	4-クロロフェノキシフェニル	
219	2,4-ジクロロフェノキシフェニル	
220	2,4,6-トリクロロフェノキシフェニル	

第3表

X=Hの場合

被置換化合物	R	ロイコトリエン類合成 50%阻害濃度 (μM)
	ヘキシル	700
	デシル	200

【0057】

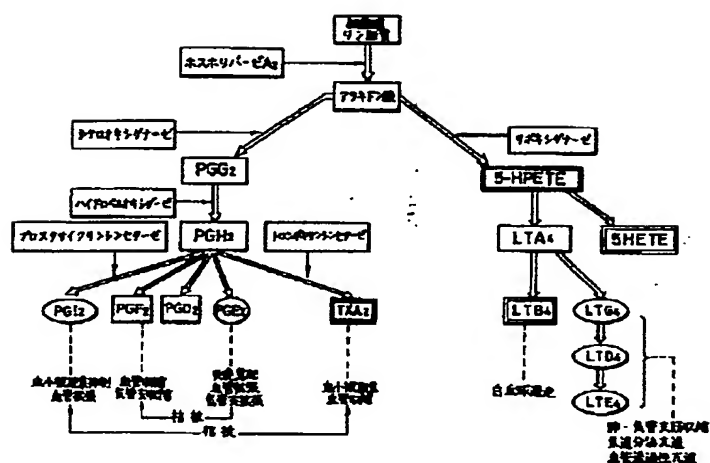
【発明の効果】以上説明した如くに、本発明の抗炎症剤によれば、高いプロスタグランジン類及びロイコトリエン類生成阻害効果を有する。従って、プロスタグラン

ジン類及びロイコトリエン類の増加に起因する炎症及びその他の疾病に対する治療効果を奏するものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】アラキドン酸カスケードを示す説明図。

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/165	ACS	8413-4C		
	ACV	8413-4C		
	ADZ	8413-4C		
	AED	8413-4C		
C 0 7 C 235/58		7106-4H		
235/60		7106-4H		
235/62		7106-4H		
235/64		7106-4H		
C 1 2 N 9/99		7823-4B		

(72)発明者 古野 雅弘
 神奈川県横浜市緑区梅が丘6番地2 日本
 たばこ産業株式会社生命科学研究所内

(72)発明者 松本 隆志
 神奈川県横浜市緑区梅が丘6番地2 日本
 たばこ産業株式会社生命科学研究所内

(72)発明者 柴垣 真
 神奈川県横浜市緑区梅が丘6番地2 日本
 たばこ産業株式会社生命科学研究所内

(72)発明者 野間 正名
 神奈川県横浜市緑区梅が丘6番地2 日本
 たばこ産業株式会社生命科学研究所内

(72)発明者 吉田 茂男
 東京都練馬区真井3の28の15

(72)発明者 米山 弘一
 栃木県宇都宮市陽南4の10の5 515号

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.